

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年5月23日 (23.05.2002)

PCT

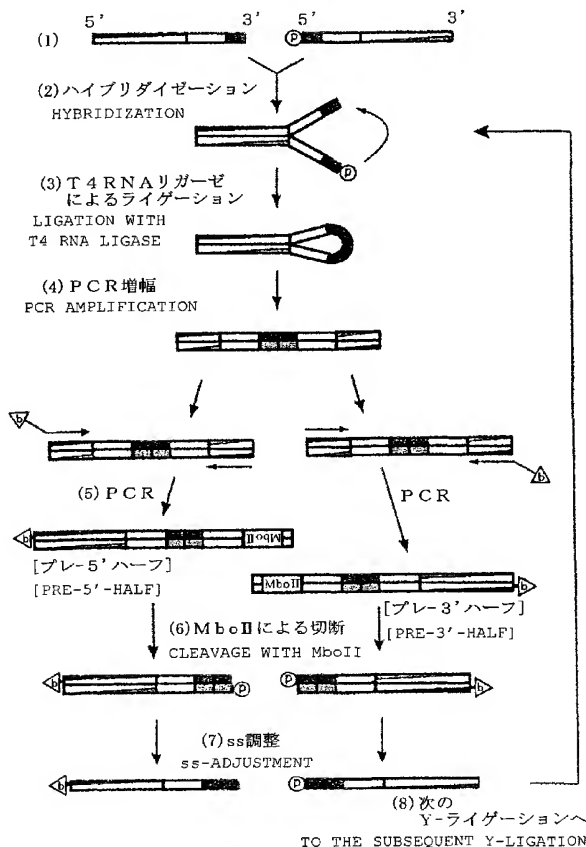
(10) 国際公開番号
WO 02/40664 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/10, (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ジェンコム (GENCOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒194-8511 東京都町田市南大谷11号 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/09200 (72) 発明者; および
- (22) 国際出願日: 2001年10月19日 (19.10.2001) (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西垣功一 (NISHIGAKI, Koichi) [JP/JP]; 〒362-0072 埼玉県上尾市中妻3-18-26 Saitama (JP). 木下保則 (KINOSHITA, Yasunori) [JP/JP]; 〒351-0114 埼玉県和光市本町10-12 Saitama (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-346467 2000年11月14日 (14.11.2000) JP
特願2001-308277 2001年10月4日 (04.10.2001) JP
- (74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CONSTRUCTING NUCLEIC ACID LIBRARY

(54) 発明の名称: 核酸ライブラリーの作製方法



(57) Abstract: It is intended to establish a method of constructing a nucleic acid library by using the Y-ligation method. Namely, a method of constructing a nucleic acid library which involves the following steps (1) to (7): (1) preparing a first single-stranded nucleic acid and a second single-stranded nucleic acid each having a stem sequence and a branch sequence and a base sequence encoding an amino acid at the 3'-end; (2) hybridizing the first single-stranded nucleic acid with the second single-stranded nucleic acid between the stem sequences thereof; (3) treating the hybridized product with T4 RNA ligase to thereby ligate the 3'-end of the single-stranded nucleic acid to the 5'-end of the second single-stranded nucleic acid; (4) using the double-stranded nucleic acid obtained in the step (3) as a template, carrying out PCR with the use of primers modified in the 5'-side with a substance having affinity to thereby prepare double-stranded nucleic acids; (5) treating two double-stranded nucleic acids obtained in the step (4) with a restriction enzyme to give double-stranded nucleic acids respectively having base sequences encoding the first and second amino acids at the 3'- or 5'-end; (6) using the binding ability of the substance having affinity introduced in the step (4), preparing single-stranded nucleic acids from the double-stranded nucleic acids obtained in the step (5); and (7) using the single-stranded nucleic acids obtained in the step (6), repeating the steps (2) to (6) needed times.

[続葉有]

WO 02/40664 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明の目的は、Y-ライゲーション法を利用した核酸ライブラリーを構築する方法を確立することである。本発明によれば、以下の工程（１）から（７）を含む、核酸ライブラリーの作製方法が提供される。

（１）ステム配列とブランチ配列とを有し、3'末端にアミノ酸をコードする塩基配列を有する、第１の一本鎖核酸と第２の一本鎖核酸とを用意し、

（２）第１の一本鎖核酸と第２の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

（３）ハイブリダイズした生成物をT4 RNA リガーゼで処理して、第１の一本鎖核酸の3'末端と第２の一本鎖核酸の5'末端とを連結し、

（４）工程（３）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾したプライマーを使用するPCRを行い二本鎖核酸を調製し、

（５）工程（４）で得た２種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々3'末端又は5'末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

（６）工程（４）で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程（５）で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

（７）工程（６）で得た一本鎖核酸を用いて工程（２）から工程（６）を必要な回数だけ繰り返す。

明細書

核酸ライブラリーの作製方法

技術分野

本発明は、核酸ライブラリーの作製方法に関する。より詳細には、本発明は、末端に互いに相補的配列（ステム部分）を有する二本の一本鎖核酸をハイブリダイゼーション後、一本鎖領域（ブランチ部分）の末端をRNAリガーゼで連結するY-ライゲーション法を利用することを特徴とする核酸ライブラリーの作製方法に関する。本発明は、上記核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーおよび該核酸ライブラリーを用いて得られるペプチドライブラリーに関する。

背景技術

進化分子工学ではダーウィンの進化原理に基づいて有用な生体高分子を獲得することを目的としている。この方法は、1) 変異体ライブラリーの構築、2) より有用な分子種の選択、3) その遺伝子型への突然変異導入と増幅、4) その変異体集団の発現、の要素から成り立ち、2) から4) のステップを繰り返すことにより行われる。

有用なペプチドまたはタンパク質を探索していく場合、突然変異の導入や発現型の同定の簡便さからDNAの変異体ライブラリー構築し、この遺伝子型を対応させた形でタンパク質を発現して機能に基づく選択を行う方法が採られることが多い。そこで出発点であるDNAライブラリーの特性は、有用なペプチドまたはタンパク質を獲得する上で成功の決め手となる重要な因子の一つと言える。

従来、DNA変異体ライブラリーの構築はヌクレオチドレベルで行われており、化学的方法と酵素的方法がある。前者はDNA合成機を使用してDNAを合成する際、原料のヌクレオチドを特定の割合で混合しておく方法が採られる。また、後者は、DNAまたはRNAポリメラーゼを特殊な条件で使用して突然変異を誘

発する方法や、DNAシャフリングと称して複数の類似する遺伝子を細分化し、再構成することでキメラ遺伝子を作成する方法などがあり各々成果を上げている。

一方で、本発明者らはブロック単位の変異体集団という全く新しい変異体集団の構築に挑戦しており、ブロック・シャフリング法と呼んでいる。タンパク質をコードするDNAライブラリーを構築する場合、タンパク質の階層的構成単位を変異単位に設定することを提案している。進化分子工学において変異体集団の中から有用な機能性高分子を創製する試みは、広大な配列空間を探索することにとえられ、従来から行われている遺伝子の点突然変異体集団から出発する方法は、野生型タンパク質の周辺を小股で探索することに相当するといえる。一方、ブロック単位の変異体集団は野生型タンパク質から遠く離れた配列空間を大股で歩行することに当たる。この大股歩行によって期待する機能物質に行き当たるか否かは配列空間の適応度地形の形状が重要な鍵を握っているといえるが、現在ではそのデータを蓄積している段階であって明確なことはまだ言えない。

しかし、一方で、分子進化の理論的研究は、天然のタンパク質の一次配列と構造解析からタンパク質の多くがエクソン・シャフリングというメカニズムを通して多様な機能を獲得してきたことを示すデータを蓄積している。このアイデアはタンパク質のモジュール構造の境界とその遺伝子のイントロンの位置に有意に相関関係が見られることに基づいている。つまり、現存する多様なタンパク質は機能単位としてのエクソンと進化デバイスとしてのイントロンがシャフリング・メカニズムを通して発展してきた産物と見るのが可能である。この事は、変異単位としてブロックを使用することの有効性を支持するものであり、本発明者らは工学に応用しうる一般的な手法としてブロック・シャフリング法の確立をめざしている。ブロック・シャフリングの利点の一つとして、配列空間の探索の歩幅を自由に設計できることが挙げられる。点突然変異ライブラリーは構築されるロットによってその組成が変化してしまい各探索試行が独立していて互いに参考にならない。一方、ブロック・シャフリングでは、そのブロックの種類や長さを決定する際に探索経歴を考慮した設計が可能であり、より効率的探索を目指してプロ

ック設計のノウハウを蓄積していける点で優れている。

機能性タンパク質の創製をめざす場合、そのもっとも基本的構成単位はアミノ酸をコードしているトリヌクレオチド、すなわちコドンである。コドン・アミノ酸対応表は全てのトリヌクレオチドが何らかのアミノ酸や終止コドンをコードしていることを示している。従って、ヌクレオチド単位のランダム変異体集団も全てのアミノ酸を網羅することになる。しかし、そこには重大な欠点がある。つまり、ある確率で必ず終止コドンが発生してしまい未成熟なペプチド鎖が生成してしまうことが挙げられる。また、タンパク質の翻訳系によってコドンの使用頻度に差があることが知られている。実験的に取り扱える物質には限界があるので、大きなライブラリーのサイズを確保するためにも効率的なコドンの使用が望ましい。ブロック・シャフリングはこのような問題を回避することが可能である。

本発明者らはこれまでにY-ライゲーション法というDNAを効率的に連結する方法を開発している。このY-ライゲーション法は、二本の一本鎖DNA (5' - ハーフおよび3' - ハーフ) の末端に互いに相補的配列 (ステム部分) を含めておき、ハイブリダイゼーション後、一本鎖領域 (ブランチ部分) の末端をRNAリガーゼで連結する方法である。Y-ライゲーション法の模式図を図1に示す。

しかしながら、Y-ライゲーション法の応用、特にDNAライブラリーやタンパク質ライブラリーを作製する試みはなされていない。

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、Y-ライゲーション法を利用した核酸ライブラリーを構築する方法を確立することである。

本発明者らは、5' 側から3' 側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3' 末端に第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第1の一本鎖核酸と、3' 側から5' 側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5' 末端に第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第2の一本鎖核酸とを用いて、各ステム配列間でハイブリダイズさせた後、T4 RNA リガーゼ

で処理して、第1の一本鎖核酸の3'末端と第2の一本鎖核酸の5'末端とを連結し、続いてPCRと制限酵素処理を行なうという操作を繰り返すことにより、核酸ライブラリーを作製できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、以下の工程(1)から(7)を含む、核酸ライブラリーの作製方法が提供される。

(1) 5'側から3'側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3'末端に第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第1の一本鎖核酸と、3'側から5'側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5'末端に第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第2の一本鎖核酸とを用意し、

(2) 第1の一本鎖核酸と第2の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

(3) ハイブリダイズした生成物をT4 RNA リガーゼで処理して、第1の一本鎖核酸の3'末端と第2の一本鎖核酸の5'末端とを連結し、

(4) 工程(3)で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾したプライマーを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程(3)で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾したプライマーを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、

(5) 工程(4)で得た2種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々3'末端又は5'末端に第1のアミノ酸と第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

(6) 工程(4)で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程(5)で

得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

(7) 工程 (6) で得た一本鎖核酸を用いて工程 (2) から工程 (6) を必要な回数だけ繰り返す:

本発明の一例としては、以下の工程 (1) から (7) を含む核酸ライブラリーの作製方法が提供される。

(1) 5' 側から 3' 側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3' 末端に第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第 1 の一本鎖核酸と、3' 側から 5' 側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5' 末端に第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第 2 の一本鎖核酸とを用意し、

(2) 第 1 の一本鎖核酸と第 2 の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

(3) ハイブリダイズした生成物を T4 RNA リガーゼで処理して、第 1 の一本鎖核酸の 3' 末端と第 2 の一本鎖核酸の 5' 末端とを連結し、

(4 a) 連結産物を一本鎖核酸にした後、相補鎖を合成して二本鎖核酸を調製し、

(4 b) 工程 (4 a) で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5' 側を親和性物質で修飾したフォワードプライマーと制限酵素認識配列を含むリバースプライマーとを使用する PCR を行い、5' 側から 3' 側の方向にステム配列、ブランチ配列、第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列、第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程 (4 a) で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含むフォワードプライマーと 5' 側を親和性物質で修飾したリバースプライマーとを使用する PCR を行い、5' 側から 3' 側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列、第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、

(5) 工程 (4 b) で得た 2 種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々 3' 末端又は 5' 末端に第 1 のアミノ酸と第 2 のアミノ酸をコードする塩基

配列を有する二本鎖核酸を調製し、

(6) 工程(4b)で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程(5)で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

(7) 工程(6)で得た一本鎖核酸を用いて工程(2)から工程(6)を必要な回数だけ繰り返す：

本発明の別の一例としては、以下の工程(1)から(7)を含む核酸ライブラリーの作製方法が提供される。

(1) 5'側から3'側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3'末端に第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第1の一本鎖核酸と、3'側から5'側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5'末端に第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第2の一本鎖核酸とを用意し、

(2) 第1の一本鎖核酸と第2の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

(3) ハイブリダイズした生成物をT4 RNA リガーゼで処理して、第1の一本鎖核酸の3'末端と第2の一本鎖核酸の5'末端とを連結し、

(4) 工程(3)で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾した、第1の一本鎖核酸のステム配列にアニールするフォワードプライマーと、制限酵素認識配列を含み、第2の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列、及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程(3)で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含み、第1の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするフォワードプライマーと、5'側を親和性物質で修飾した、第2の一本鎖核酸のステム配列にアニールするリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向に制限酵素認

識配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、
(5) 工程(4)で得た2種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々3'末端又は5'末端に第1のアミノ酸と第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

(6) 工程(4)で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程(5)で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

(7) 工程(6)で得た一本鎖核酸を用いて工程(2)から工程(6)を必要な回数だけ繰り返す：

好ましくは、第1の一本鎖核酸として、異なる複数種の第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用し、第2の一本鎖核酸として、異なる複数種の第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用する。

好ましくは、ステム配列の長さが10から100塩基である。

特に好ましくは、第1の一本鎖核酸のステム配列は5'側から3'側の方向においてGGCTCGCGAATACTTTG(配列番号1)であり、第2の一本鎖核酸のステム配列は3'側から5'側の方向においてCCGAGCGCTTATGAAC(配列番号2)である。

好ましくは、ブランチ配列の長さは10から100塩基である。

特に好ましくは、第1の一本鎖核酸のブランチ配列は5'側から3'側の方向においてAAGATCTCTTTT(配列番号3)であり、第2の一本鎖核酸のブランチ配列が3'側から5'側の方向においてTTGCCCTAGGGGAT(配列番号4)である。

好ましくは、工程(4)において、連結産物を変性条件下において一本鎖核酸にした後、PCRにより増幅して二本鎖核酸を調製する。

好ましくは、工程(4)で使用するプライマーにおける親和性物質はビオチンである。

好ましくは、工程（４）で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列は、切断部位が認識配列に含まれない制限酵素の認識配列である。

好ましくは、工程（４）で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列は、認識配列から離れたところで切断する制限酵素の認識配列である。

好ましくは、工程（４）で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列は、MboII の認識配列である。

好ましくは、工程（２）から工程（６）を合計４回繰り返すことにより１６アミノ酸をコードする塩基配列を含む核酸のライブラリーが作製される。

本発明の別の側面によれば、上記した核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーを用いて得られる、ペプチドライブラリーが提供される。

図面の簡単な説明

図１は、Ｙ－ライゲーション法の模式図を示す。

図２は、本発明の方法の具体的な実施態様の一つの概要を示す図である。

図３は、Ｔ４ RNA リガーゼの基質の構造（a）および導入される制限酵素の認識配列と切断部位の関係（b）を示す。

図４は、本発明の方法の各サイクルで増幅した連結産物を変性 PAGE および銀染色で分析した結果を示す。

図５は、本発明の方法による１回目のＹＬＢＳサイクル後の反応産物を電気泳動で分析した結果を示す。

図６は、本発明の方法による２回目及び３回目のＹＬＢＳサイクル後の反応産物を電気泳動で分析した結果を示す。

図７は、３回目のＹＬＢＳサイクル後のライゲーション産物をシーケンスした結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の核酸ライブラリーの作製方法は、工程（１）から（７）を含むことを特徴とする。

本発明の方法における工程（１）は、５'側から３'側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、３'末端に第１のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第１の一本鎖核酸と、３'側から５'側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、５'末端に第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第２の一本鎖核酸とを用意する工程である。

ランダムなアミノ酸配列、即ち、互いに異なる任意のアミノ酸をコードする塩基配列から成る核酸ライブラリーを作製するためには、第１の一本鎖核酸（以下、５'ハーフ鎖とも称する）として、異なる複数種の第１のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用し、第２の一本鎖核酸（以下、３'ハーフ鎖とも称する）として、異なる複数種の第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用する。

異なる複数種のアミノ酸としては、例えば、天然の２０種のアミノ酸の中から選ばれる任意の２以上のアミノ酸を挙げることができる。アミノ酸の種類数は特に限定されない。また、天然のアミノ酸は、脂肪族アミノ酸（グリシン、アラニン）、分枝アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）、ヒドロキシアミノ酸（セリン、トレオニン）、酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）、アミド（アスパラギン、グルタミン）、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン）、含硫黄アミノ酸（システイン、メチオニン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン）、複素環式アミノ酸（トリプトファン、ヒスチジン）、イミノ酸（プロリン）に分類することができるが、各グループの中から１種のアミノ酸を代表として選択して使用してもよい。本明細書中後記する実施例では、アミノ酸の性質を代表する７つのアミノ酸としてグリシン、イソロイシン、アスパラギ

ン酸、リシン、セリン、システイン、プロリンを選択しているが、これは本発明の一例を示すものに過ぎない。

5' ハーフ鎖および3' ハーフ鎖におけるステム配列の長さは、両鎖がハイブリダイズすることができるのに十分な長さであれば特に限定されず、好ましくは、10から100塩基、より好ましくは10から30塩基程度である。

5' ハーフ鎖のステム配列と3' ハーフ鎖のステム配列とは互いに相補的であり、これにより5' ハーフ鎖と3' ハーフ鎖は一定の条件下でハイブリダイズすることが可能になる。より詳細には、5' ハーフ鎖のステム配列（5' 方向から3' 方向）は3' ハーフ鎖のステム配列（3' 方向から5' 方向）と相補的であるため両鎖がハイブリダイズすることにより両方のステム配列は二本鎖を形成し、5' ハーフ鎖のブランチ鎖と3' ハーフ鎖のブランチ鎖は一本鎖のまま存在するため、全体としてはY字の形を形成することになる（図1を参照）。Y-ライゲーションという名称はこの構造体の形に由来する。この方法の特徴は二本のDNAを連結する反応を分子間反応から分子内反応としたことにより連結効率を向上させることができる点にある。従って、低濃度の基質についても応用することが可能である。

第1の一本鎖核酸のステム配列の一例としては、5' 側から3' 側の方向においてGGCTCGCGAATACTTTG（配列番号1）、第2の一本鎖核酸のステム配列の一例としては3' 側から5' 側の方向においてCCGAGCGCTTATGAAAC（配列番号2）が挙げられる。

5' ハーフ鎖および3' ハーフ鎖におけるブランチ配列の長さは、5' ハーフ鎖の3' 末端の塩基と3' ハーフ鎖の5' 末端の塩基とが、T4 RNA リガーゼ処理により連結できる程度の長さであれば特に限定されない。一般にブランチ配列の長さは短い方が連結効率は高いが、両鎖合わせて約300ヌクレオチドの基質をかなりの効率で連結することが可能であることが分かっている。また、両鎖を1対1の化学量論比で反応させることになることから、原料に対する生成物の歩留まりを向上することとなりコスト低減や精製操作の簡便化を計ることが可能とな

る。ブランチ配列の長さは、好ましくは10から100塩基、より好ましくは10から30塩基程度である。5' ハーフ鎖のブランチ配列と3' ハーフ鎖のブランチ配列の長さは同一でも異なってもよい。

ブランチ配列の中には、本明細書中後記するような制限酵素認識配列が含まれていてもよい。

第1の一本鎖核酸のブランチ配列の一例としては、5' 側から3' 側の方向においてAAGATCTCTTT（配列番号3）、第2の一本鎖核酸のブランチ配列としては、3' 側から5' 側の方向においてTTGCCCTAGGGGAT（配列番号4）が挙げられる。

工程（1）で用いる5' ハーフ鎖および3' ハーフ鎖は、通常のDNA合成法（DNAの合成器を利用して合成する方法）により合成することができる。また、3' ハーフ鎖の5' 末端はリン酸化したものをを用いることにより、5' ハーフ鎖の3' 末端と結合することが可能になる。

本発明の方法における工程（2）は、第1の一本鎖核酸と第2の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせる工程である。

具体的には、工程（1）で用意した5' -ハーフ鎖および3' -ハーフ鎖を、好適な緩衝液中で94℃で5分間加熱した後、例えば、60℃で15分間保温することにより相補的なステム配列をハイブリダイズさせることができる。ハイブリダイゼーションの条件（緩衝液の組成、およびハイブリダイゼーション温度）は、ステム配列の長さや塩基組成などに応じて適宜設定することができる。

本発明の方法における工程（3）は、工程（2）でハイブリダイズした生成物をT4 RNA リガーゼで処理して、第1の一本鎖核酸の3' 末端と第2の一本鎖核酸の5' 末端とを連結する工程である。

なお、ハイブリダイゼーション溶液としてT4 RNA リガーゼの緩衝液として適当なものを使用した場合には、ハイブリダイゼーション生成物を含む溶液をそのままリガーゼ反応に使用することができ、そうでない場合には、ハイブリダイゼーション生成物を通常のDNA精製方法により回収した後、T4 RNA リガーゼ用の緩

衝液に溶解してリガーゼ反応用の溶液を調製する。このような溶液に、ATP と T4 RNA リガーゼを添加して適当な温度（例えば、25℃）で一定時間（例えば、16時間）反応させることにより、リガーゼ反応を行なう。これにより第1の一本鎖核酸の3'末端と第2の一本鎖核酸の5'末端とが連結される。

本発明の方法における工程（4）は、工程（3）で得た二本鎖核酸を鋳型にしたPCRにより、

5'側から3'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸；並びに、

5'側から3'側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸；

を調製する工程である。

工程（4）の第1の具体例においては、（4a）連結産物を一本鎖核酸にした後、相補鎖を合成して二本鎖核酸を調製し、次いで

（4b）工程（4a）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾したフォワードプライマーと制限酵素認識配列を含むリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程（4a）で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含むフォワードプライマーと5'側を親和性物質で修飾したリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製する。

なお、本明細書で工程（4）と称する場合、上記工程（4a）及び工程（4b）を包含するものとする。

工程（４ a）は、連結産物を一本鎖核酸にした後、相補鎖を合成して二本鎖核酸を調製する工程である。工程（３）で得られる連結産物は、５′ ハーフ鎖および３′ ハーフ鎖のステム配列は二本鎖を形成しており、その二本鎖の末端から、５′ ハーフ鎖のブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、及び３′ ハーフ鎖のブランチ配列の順にループ構造を形成している。この連結産物は、変性条件下に置くことにより一本鎖核酸にすることができる。連結産物の一本鎖核酸は、５′ 側から３′ 側の方向に５′ ハーフ鎖のステム配列、５′ ハーフ鎖のブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、３′ ハーフ鎖のブランチ配列、及び３′ ハーフ鎖のステム配列を有するものである。

工程（４ a）では、この一本鎖核酸に対してその相補鎖を合成して二本鎖核酸を調製する。二本鎖核酸は、上記一本鎖核酸を鋳型にしたＰＣＲにより行なうことが好ましく、これにより所望の二本鎖核酸を増幅することができる。

工程（４ b）は、工程（４ a）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、５′ 側を親和性物質で修飾したフォワードプライマーと制限酵素認識配列を含むリバースプライマーとを使用するＰＣＲを行い、５′ 側から３′ 側の方向にステム配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程（４）で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含むフォワードプライマーと５′ 側を親和性物質で修飾したリバースプライマーとを使用するＰＣＲを行い、５′ 側から３′ 側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製する工程である。

工程（４ b）で使用するプライマーにおける親和性物質は、プライマーに導入することが可能であり、工程（７）での一本鎖核酸の調製を可能にするものであれば特に限定されない。親和性物質の例としては、ビオチンが挙げられ、この場合、工程（７）では、ストレプトアビジンを使用してビオチンで標識された一本

鎖核酸を回収することができる。

工程（４）の第２の具体例においては、工程（３）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、５’側を親和性物質で修飾した、第１の一本鎖核酸のステム配列にアニールするフォワードプライマーと、制限酵素認識配列を含み、第２の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするリバースプライマーとを使用するＰＣＲを行い、５’側から３’側の方向にステム配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列、及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程（３）で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含み、第１の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするフォワードプライマーと、５’側を親和性物質で修飾した、第２の一本鎖核酸のステム配列にアニールするリバースプライマーとを使用するＰＣＲを行い、５’側から３’側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、（５）工程（４）で得た２種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々３’末端又は５’末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製する。

この第２の具体例では、上記した第１の具体例における工程（４ａ）及び（４ｂ）を１回のＰＣＲで行うことを特徴とする。ＰＣＲ反応では、変異の挿入等の結果、最終の連結産物に変異が導入され、アミノ酸の置換、フレームシフト、終止コドンの挿入等の問題が生ずる可能性がある。そこで、このＰＣＲによる変異の導入を少なくすることが好ましい。そこで、工程（４ａ）のライゲーション産物の増幅、及び工程（４ｂ）の次サイクルの原料調製を目的としたＰＣＲを、一度のＰＣＲ操作により同時に実施することにした。この第２の具体例の方法では、ステム配列とブランチ配列（実施例では part 配列と表示）のプライマー（stem primer、part primer）を用いてＰＣＲを実施し、ライゲーション産物のＰＣＲ増幅を行う。この方法により、アミノ酸をコードする塩基配列のサイクルの繰り返

しによる連結により作製される核酸ライブラリーへの変異の導入頻度を軽減することができ、その結果として、ライブラリーの質の向上が達成できる。

上記した工程（４）は、次のサイクルの原料を製造するために二組のPCRを行う工程であり、工程（２）から工程（３）で調製した連結物にステム部分と制限酵素認識配列を導入する工程である。

工程（４）で調製される、５'側から３'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸においては、次の工程（５）における制限酵素により、第２のアミノ酸をコードする塩基配列の３'末端で切断されるように制限酵素認識配列が導入されている。

同様に、工程（４）で調製される、５'側から３'側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸においては、次の工程（５）における制限酵素により、第１アミノ酸をコードする塩基配列の５'末端で切断されるように制限酵素認識配列が導入されている。

工程（４）で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列は、切断部位が認識配列に含まれない制限酵素の認識配列であり、好ましくは認識配列から離れたところで切断する制限酵素の認識配列であり、例えば、MboIIの認識配列である。

本発明で用いる「切断部位が認識配列に含まれない制限酵素」としては、認識配列のすぐ外側で切断する酵素と認識配列から遠く離れたところを切断する酵素の２種類が挙げられる。本発明では下記の酵素の中から適当なものを選択して使用することができる。

認識配列のすぐ外側で切断する酵素の例としては、以下のものが挙げられる。

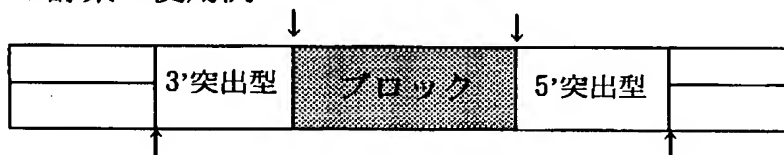
表 1 :

5' 突出型切断	認識配列	3' 突出型切断	認識配列
TspEI	^AATT_	Chai	_GATC^
SelI	^CGCG_	NlaIII	_CATG^
MboI	^GATC_	TaiI	_ACGT^
SsoII	^CCNGG_	Hpy99I	_CGWCG^
EcoHI	^CCSGG_	TspRI	_NNCASTGNN^
EcoRII	^CCWGG_		
UnbI	^GGNCC_		
VpaK11AI	^GGWCC_		
MaeIII	^GTNAC_		
Tsp45I	^GTSAC_		

‘^’ は表示された認識配列側、‘_’ はその相補鎖側の切断部位を示す。

‘W’ は A または T、‘S’ は C または G を表している。

このタイプの酵素の使用例



認識配列から遠く離れたところを切断する酵素の例としては、以下のものが挙げられる。

表 2 :

酵素名	認識配列	isozyme
AceIII	CAGCTCNNNNNN~NNNN_	
AloI	~NNNNN_NNNNNNGAACNNNNNNNTCCNNNNNNN_NNNNN~	
BaeI	~NNNNN_NNNNNNNNNACNNNNGTAYCNNNNNNN_NNNNN~	
Bbr7I	GAAGACNNNNNN~NNNN_	
BbvI	GCAGCNNNNNNNN~NNNN_	AlwXI BseKI BseXI Bsp423I Bst12I Bst71I
BbvII	GAAGACNN~NNNN_	BbsI Bbv16II BpiI BpuAI Bsc9II BspBS31I BspIS4I BspTS514I BstBS32I BstTS5I
Bce83I	CTTGAGNNNNNNNNNNNN~NN~	
BceII	ACGGCNNNNNNNNNNNN~N_	BceAI
BcgI	~NN_NNNNNNNNNCGANNNNNNNTGCNNNNNNNNN_NN~	
BciVI	GTATCCNNNNN_N~	BfuI
BfiI	ACTGGGNNNN_N~	BmrI
BinI	GGATCNNNN~N_	AclWI AlwI BspPI BstH9I Bst31TI
BplI	~NNNNN_NNNNNNNNGAGNNNNNCTCNNNNNNNN_NNNNN~	
BsaXI	~NNN_NNNNNNNNACNNNNNCTCCNNNNNNN_NNN~	
BscAI	GCATCNNNN~NN_	
BseMII	CTCAGNNNNNNNN~NN~	
BseRI	GAGGAGNNNNNNNN~NN~	
BsgI	GTGCAGNNNNNNNNNNNN~NN~	
BsmI	GAATG_CN~	Asp26HI Asp27HI Asp35HI Asp36HI Asp40HI Asp50HI BsaMI BscCI Mva1269I
BsmAI	GTCTCN~NNNN_	Alw26I BsoMAI
BsmFI	GGGACNNNNNNNNNN~NNNN_	BspLU111II BstOZ616I
Bsp24I	~NNNNN_NNNNNNNNGACNNNNNNNTGGNNNNNNN_NNNNN~	
BspMI	ACCTGCNNNN~NNNN_	Acc36I BfuAI
BsrI	ACTG_GN~	BseII BseNI BsrSI Bst11I TspII Bse3DI BseMI BseGI
BsrDI	GCAATG_NN~	
BstF5I	GGATG_NN~	
BtsI	GCAGTG_NN~	
CjeI	~NNNNN_NNNNNNNCCANNNNNNGTNNNNNNNNN_NNNN~	

表 3 :

CjePI	~NNNNNN_NNNNNNNCCANNNNNNNTCNNNNNNNN_NNNNN N~	
EciI	GGCGGANNNNNNNNNN_NN~	
Eco31I	GGTCTCN~NNNN_	Bli736I BsaI Bso31I EcoA4I EcoO44I
Eco57I	CTGAAGNNNNNNNNNNNNNN_NN~ BspKT5I	
Esp3I	CGTCTCN~NNNN_	BsmBI BstGZ53I
FauI	CCCGCNNNN~NN_	BstFZ438I
FokI	GGATGNNNNNNNN~NNNN_	BstPZ418I
GsuI	CTGGAGNNNNNNNNNNNNNN_NN~	BpmI
HaeIV	~NNNNNN_NNNNNNGAYNNNNNRTCNNNNNNNN_NNNNN ~	
HgaI	GACGCNNNN~NNNN_	AsuHPI
HphI	GGTGANNNNNN_N~	Bco5I Bco116I BcoKI
Ksp632I	CTCTTCN~NNN_	BseZI Bsu6I Eam1104I EarI
MboII	GAAGANNNNNN_N~	
MlyI	GAGTCNNNN~	SchI
MmeI	TCCRACNNNNNNNNNNNNNNNNNN_NN~	
MnlI	CCTCNNNNNN_N~	
PleI	GAGTCNNNN~N_	PpsI
PpiI	~NNNNN_NNNNNNGAACNNNNNCTCNNNNNNNN_NNNNN~	
RleAI	CCCACANNNNNNNNNN_NNN~	
SapI	GCTCTTCN~NNN_	VpaK32I
SfaNI	GCATCNNNN~NNNN_	BspST5I PhaI
SspD5I	GGTGANNNNNNNN~	
Sth132I	CCCGNNNN~NNNN_	
StsI	GGATGNNNNNNNNNN~NNNN_	
TaqII	GACCGANNNNNNNNNN_NN~, CACCCANNNNNNNNNN_NN~	
TspRI	_NNCASTGNN~	
Tth111I	CAARCANNNNNNNNNN_NN~	
I		

本発明の方法における工程（５）は、工程（４）で得た２種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々３′末端又は５′末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製する工程である。

工程（５）で用いる制限酵素は、工程（４）で導入した制限酵素認識配列を認識する制限酵素である。

本発明の方法における工程（６）は、工程（４）で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程（５）で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製する工程である。

工程（６）により、５′側から３′側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、３′末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸と、３′側から５′側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、５′末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸とが調製される。即ち、工程（６）で調製される２種の一本鎖核酸はそれぞれ、工程（１）で用意した第１の一本鎖核酸の３′末端に第２のアミノ酸をコードする塩基配列を追加した核酸と、工程（１）で用意した第２の一本鎖核酸の５′末端に第１のアミノ酸をコードする塩基配列を追加した核酸とに対応する。

工程（６）により、次のサイクルに使用するための２種類の一本鎖核酸が得られることになる。なお、ライブラリーとしては、工程（３）で一本鎖連結物が得られ、工程（４）で二本鎖化DNAが得られたことになる。

本発明の方法における工程（７）は、工程（６）で得た一本鎖核酸を用いて工程（２）から工程（６）を必要な回数だけ繰り返す工程である。

このようにして連結されるブロック数はサイクル数に応じて２、４、８、１６、と指数関数的に増加していく。この特性は長いシャフリング物を構築する際には反応段数を少なくできるという意味で重要な利点となる。

本発明では、ペプチド・タンパク質ライブラリーの構築を最終目標として捕らえ、その最小単位としてのコドン（トリヌクレオチド）をブロックとしたが、ブ

ブロック長は任意の長さに設定することができる。コドンが複数個連結したブロックから出発することも可能である。その延長上にはタンパク質の構造単位（例えば α -ヘリックス、 β シート、モジュール、ドメインなどの構造単位）でのシャフリングがある。機能性ペプチドとしては小さいものは数残基アミノ酸から成り立つものも知られているが、多彩な機能を発現するには多様な構造体を形成する長さを有していることが必要であると考えられる。このような観点から十数残基のアミノ酸からなるペプチドはフレキシブルな構造体を形成する最適な長さであると言える。本明細書の実施例で示したような16アミノ酸からなるペプチドは、工程（2）～（6）を4サイクル回しただけで構築しうることや、機能発現の高いポテンシャルを有する長さであるという意味で重要である。

本明細書の実施例では、各サイクルで連結反応させる5'-ハーフ鎖および3'-ハーフ鎖のブロック数は同数となるように操作を進めたが、偶数個と奇数個のブロック数の基質を用いることで任意のブロック数を有するシャフリング体の構築を行なうことも可能である。例えば、12ブロック長のライブラリーを構築する場合には、工程（2）～（6）を3サイクル回し、第4サイクル目は第3サイクルの生成物と第2サイクルの生成物から調製した5'-ハーフ鎖および3'-ハーフ鎖を使用すればよい。

これは、本発明の方法の大きな利点の一つである。即ち、一度、各サイクルで構築されたライブラリーは、PCRで増幅することにより任意に再生して使用することが可能である。このことは単にブロック長の調節のみにとどまらず、異なるブロックから構築されたライブラリーとのドッキングも可能にするという意味で、探索する配列空間の範囲を大きく広げることになる。

本発明における核酸とは、DNA及びRNAを含む最も広い意味で使用され、DNAやRNAの類似体も含まれる。

近年、DNA、RNA、その類似体など核酸自体の酵素活性や結合活性がクローズアップされ、その応用も盛んに行われている。このような知見をブロック設計に生かし、新しい機能性核酸の創製に応用していくことに、本発明の方法は適

している。

本明細書の実施例においては、48ヌクレオチドのDNAを生成したが、原料も含めて5'-ハーフ鎖および3'-ハーフ鎖はRNAに置き換えることが可能である。DNAの連結にはRNAリガーゼの活性を応用していることから理解されるように、基質をRNAとして連結することは効率の向上につながるようになる。この場合、ステム領域にプロモーターを含めておくことで達成される。

最終的なDNAライブラリーもRNAに変換し、RNAライブラリーに置き換えることも可能である。また、核酸類似物質または修飾・標識を施した核酸を最終サイクルに組み込むことで、正規の核酸以外の連結物を獲得することも可能である。

上記した本発明の方法の具体的な実施態様の一つの概要を図2に示す。なお、図2は、本明細書の実施例の内容を模式化したものでもあり、本発明の範囲を限定するものではない。ここでは、制限酵素としてMboIを使用し、親和性物質としてビオチンを使用している。図2の各工程の説明を以下に記載する。

(1) 5'-ハーフおよび3'-ハーフについて、共通するステム部分と7つのトリヌクレオチドを含むDNAオリゴマーを準備する。図では単純化して単一のDNAオリゴマー鎖で説明してある。

(2) 次に、5'-ハーフと3'-ハーフをハイブリダイズする。

(3) 両鎖をT4 RNAリガーゼで連結する。

(4) 連結産物をPCRで増幅する。

(5) 次のサイクルの原料を製造するために二組のPCRを行い、連結物にステム部分と制限酵素認識配列を導入する(Pre-5'-ハーフおよびPre-3'-ハーフ)。この際ステム側のプライマーは5'ビオチン修飾を施したものを使用する。制限酵素は切断部分が認識配列に含まれないものを使用する。

(6) 制限酵素処理により不要な片方の末端を切り離す。

(7) ビオチンとストレプトアビジン・ビーズの結合能を利用して、一本鎖DNA(次のサイクルの5'-ハーフおよび3'-ハーフ)を調製する。この際必要とす

るDNAは、濃い灰色ボックスで示されるブロックを有するDNA鎖である。

(8) 工程2に戻り、ここまでの操作を所定のブロック数が連結するまで繰り返す。

本発明は、上記した核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーにも関する。

本発明の方法により得られる核酸ライブラリー中の核酸は、任意の所定の数のアミノ酸をコードする塩基配列から構成され、各アミノ酸の出現頻度についても一般的には極端な偏りは見られないことを特徴とする。

さらに本発明は、上記した核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーを用いて得られる、ペプチドライブラリーにも関する。ペプチドライブラリーは、核酸ライブラリーを適当な発現系において発現させることにより得ることができる。

ペプチドライブラリーを作製するための発現系としては、例えば、ファージディスプレイ法が挙げられる。ファージディスプレイ法は、目的の標的分子に対する親和性を有する分子を多数のペプチド、変異タンパク質、およびcDNAからスクリーニングするための強力な方法となっている。ファージディスプレイ法では、 10^8 から 10^9 個の異なる組み換え体を生成することが可能であり、これらの中から、抗原、抗体、細胞表面受容体、タンパク質シャペロン、DNA、金属イオンその他に対する親和性を有する1つ以上のクローンを選択することが可能である。ライブラリーのスクリーニングは、提示される因子がキャプシド融合タンパク質としてウィルス表面に発現されるため、多くの用途に用いることができる。ファージディスプレイ法では、(1) 表現型と遺伝型の間に物理的な関連が存在する、(2) ライブラリーから単離されたウィルス粒子は、細菌に感染させることによって再生することができる、(3) 提示された結合ペプチドまたはタンパク質の一次構造は、ウィルスゲノム中のクローニングされた断片のDNAを配列決定することによって容易に推定できる、という利点を有する。

本発明のペプチドライブラリーは、例えば、バクテリオファージによって発現

させることができる。即ち、本発明の方法で得られる核酸ライブラリーを、バクテリオファージ M13 の遺伝子 III、VI、または VIII 中にクローン化し、それによって多数のペプチド:キャプシド融合タンパク質として発現させることができる。

実施例

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

(実施例 1)

本実施例では、アミノ酸の性質を代表する 7 つのアミノ酸をコードするトリヌクレオチドをブロックとする 16 ブロックのシャフリング・ライブラリーの構築を試みた。アミノ酸とトリヌクレオチドの対応表を以下に示す。このコドンは小麦胚芽の翻訳系のコドン使用頻度を参考に選択した。

<u>アミノ酸</u>	<u>コドン</u>
G l y	G G C
I l e	A T C
A s p	G A C
L y s	A A G
S e r	T C C
C y s	T G C
P r o	C C A

また、図 3 に T4 RNA リガーゼの基質の構造 (a) および導入される制限酵素の認識配列と切断部位の関係 (b) を示す (詳細は実験操作の中で説明する)。

(実験操作)

1. 5' -ハーフおよび 3' -ハーフのライゲーシオン

各々 7 種類の 5' -ハーフ鎖および 3' -ハーフ鎖 (5' 末端リン酸化したもの) を 30 μ l のライゲーシオン緩衝液中 (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM MgCl₂, 10mg/l

BSA, 1mM hexamine cobalt chloride, 及び 25% polyethylene glycol 6000)、94°C で 5 分間加熱後、60°C に 15 分間保温して相補的なステム領域をハイブリダイズさせた (図 3 (a) を参照、図中、'N' はブロック部分のヌクレオチドを示す)。その後、0.1mM ATP と 50 units の T4 RNA ligase (Takara) を添加して 25°C で 16 時間反応させた。

2. ライゲーション産物の増幅

ライゲーション産物は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)で精製した(8M尿素8%ポリアクリルアミド, 300V, 160mA, 35分間)。目的物のバンドをゲルから切り出した後、ゲルから抽出したDNAをテンプレート(バンド抽出物50μl中の1μl)としたPCRを以下の通り行うことで精製度を上げた。この操作によって原料のDNAを除去することができる。ブロック部分に隣接する配列を含むプライマー(p1:TTGAAGATCTCTTTT(配列番号5)およびp2:TTGAACGGGATCCCCTA(配列番号6)、各10pmole)を使用した。PCR反応液(50μl)の組成は200μM dNTP、1ユニット Taq polymerase (Greignner)、50mM Tris-HCl(pH8.7)、2.5mM MgCl₂である。PCRの反応条件を以下に示す; プレ変性: 90°C, 2分; 変性: 90°C, 0.5分; アニーリング: 35°C, 1分; 伸長: 72°C, 0.5分; 30サイクル。

3. 次サイクルの原料調製を目的としたPCR

連結物の増幅物に制限酵素 MboII 認識配列およびステム部分を導入するためのPCRを行う。ここでは5'-ハーフ鎖調製用および3'-ハーフ鎖調製用に2種類のPCRを行った。

前者はプライマーとして、

p3:GGCTCGCGAATACTTTGGGGATCTCTTT(0.1pmole)(配列番号7)、

p4:TTGACGAAGATCCCCTA(10pmole)(配列番号8)、

p5:biotin-GGCTCGCGAATACTTTG(10pmole)(配列番号9)

を用いた。

また、後者はプライマーとして、
p6:ttGAAGAtctcttt(0.1pmole) (配列番号 10) 、
p7:GGCTCGCGAATACTTTGAACGGGATCCCCTA(10pmole) (配列番号 11) 、
p8:biotin-GGCTCGCGAATACTTTGAA(10pmole) (配列番号 12) を用いた。

p5 および p8 は、後に行う一本鎖DNAの調製を目的として5'末端にビオチン修飾を施したプライマーである。この配列は p3 および p6 の5'末端側の配列と同じである。プライマー配列中の下線部分は制限酵素 MboII の認識配列を示している。

4. 制限酵素処理

3'-ハーフ鎖調製用および5'-ハーフ鎖調製用のPCR産物は、各々、30 μ lの緩衝液中、50ユニットの制限酵素 Mbo II (Takara) で 37°Cで1時間インキュベートした。制限酵素部位の構造は図3(b)に示した。図中、'N' はブロックの塩基を示しており、認識配列と切断部位はそれぞれボックスと矢印で示した。連結されたブロックの瀬戸際で切断することが必要であり、切断部位が認識配列に含まれないことが制限酵素の選択条件となる。ここでは1種類の酵素を使用しているが、同様の酵素を組み合わせて使用することも可能である。

5. PCR産物からの一本鎖DNAの調製

各々の制限酵素消化物(30 μ l)を 30 μ l の 2 \times Binding and Washing 緩衝液(2 \times B & W buffer, 0.2M Tris-HCl (pH8.0), 1M NaCl, 2% Tween-20)と合わせ、予め、0.1M NaOH で洗浄し、1 \times Binding and Washing 緩衝液 (B & W buffer, 0.1M Tris-HCl (pH8.0), 0.5M NaCl, 1% Tween-20)で平衡化した60 μ l ストレプトアビジン・マグネットビーズ(ダイナビーズ M-280 streptavidin, DynaBeads) と混合した。この懸濁液を室温で1時間攪拌してPCR産物を固定化した。ビーズを100

μl の $1\times\text{B \& W}$ 緩衝液で一度、 $100\mu\text{l}$ の水で二度洗浄した後、室温で2分間 $25\mu\text{l}$ の 25% アンモニア水で二度処理して非ビオチン修飾DNA鎖を回収した。次に、ビーズを $100\mu\text{l}$ の水で二度洗浄した後、 65°C で2分間 $25\mu\text{l}$ の 25%アンモニウム水で二度処理してビオチン修飾DNA鎖を回収した。回収したアンモニア水抽出液は乾燥後、水に溶解して次サイクルの原料として使用する。3'-ハーフ鎖調製用PCR産物からの抽出物は非ビオチン修飾DNA鎖を使用し、5'-ハーフ鎖調製のPCR産物からの抽出物はビオチン修飾DNA鎖を使用する（図2を参照）。

6. 回収された3'-ハーフ鎖および5'-ハーフ鎖のライゲーション

連結物から回収された3'-ハーフ鎖および5'-ハーフ鎖は最初のライゲーション反応同様に、TRL緩衝液中でハイブリダイズさせた後、T4 RNA リガーゼによるライゲーションを行った。以後同様の操作を繰り返すことにより所定の長さとなるまでブロックを順次連結させた。

7. シャフリング物の配列決定

このブロックシャフリング・DNAをTA cloning kit (TA Cloning Kit Jr., Invitrogen)を用いてクローニングした。インサートの確認はコロニー・PCRおよび変性PAGEで行った。インサートが確認された形質転換体から、プラスミド抽出キット(Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega)を用いてプラスミドDNAを抽出した。DNA配列はDNAシーケンシング・キット(Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Amersham Pharmacia Biotech)およびDNAシーケンサー(Shimadu, DSQ2000)で行った。

(結果と考察)

1. 連結物のゲル電気泳動分析結果

各サイクルで増幅した連結産物を変性 PAGE および銀染色で分析した。結果を図 4 に示す。

各産物はプライマー領域 (32 塩基長一定) および連結ブロック領域 (3×2^n 塩基長、 n はサイクル数) を含んでいる。従って、第一サイクルでは 38bp、第二サイクルでは 44bp、第 3 サイクルでは 56bp、第 4 サイクルでは 80bp の産物が期待され、分析結果と一致している。図 4 中、レーン M は DNA のサイズマーカーであり、サイズを左に示した。

2. DNA 配列決定の結果

構築した DNA ライブラリーの一部の配列決定結果を以下の表 4 に示す。

表 4 :

: DNA ライブラリーの配列データ

#1	TTGAAGATCTCTTTTCCAGACAAGAAGAAGGACGACGGCCCATGCCAATCCCATGCATCATCTAGG GGATCCCGTTCAA	P D K K K G G G P C P I P C I I
#2	TTGAAGATCTCTTTTAAAGAACAAGGGCCCAATCATCATCCCAATCATCATCGACTCCATCGACTAGG GGATCCCGTTCAA	K K* K G P I I I P I I I D S I D
#3	TTGAAGATCTCTTTTCCATACTCCAGGATCGGCAAGTGCATCGAGTATCAAATCGACGACATCTAGG GGATCCCGTTCAA	P D* K* K* I G K C I D* I* P* I D D I
#4	TTGAAGATCTCTTTTCCACCACCCATCATCATCGGCATCCCATCCGATGACCCACCAATCAAGTAGG GGATCCCGTTCAA	P P D* I I I G I P S D* K P P I K

* mutated sequences

その他の配列結果も含めて解析した結果、PCR の際に発生したと思われる塩基置換が確認された。なお、現在使用している PCR 用 DNA ポリメラーゼは Taq DNA ポリメラーゼであるが、この酵素は合成する際に数万ヌクレオチド当たり一個の変異を導入することが知られている。

また、制限酵素の切断の際に発生したと思われる欠失突然変異も確認されたが、これは、制限酵素の切断部位の非特異性に由来すると思われる。なお、本実施例で使用した制限酵素 MboII は、認識配列から遠く離れたところを切断する酵素に

属するものである。

別の実験から、MboII の切断部位特異性が両鎖で異なることが示唆されている。

また、本実施例では 16 個のアミノ酸からなるペプチドライブラリーの構築を最終目標に設定して、7 種のトリヌクレオチドをブロックとして YLBS のサイクルを 4 サイクル回し、所定のブロック数を含むシャフリング・ライブラリーを獲得することに成功した。総合的なブロック出現頻度も以下に示すように極端な偏りは見られなかった。

コドン	GGC	ATC	GAC	AAG	TCC	TGC	CCA
	(Gly)	(Ile)	(Asp)	(Lys)	(Ser)	(Cys)	(Pro)
出現率	7.6%	22.9%	15.3%	17.8%	6.1%	6.1%	24.3%

(実施例 2)

YLBS 法を用いて DNA ライブラリーの作製を行った。

原料オリゴヌクレオチドとしては以下の配列を使用した。

5' half: GGCTCGCGAATACTGCGAA GACCACCATGNNN (32mer, 下線部分はステム領域) (配列番号 13)

stem primer(biotin 標識): GGCTCGCGAATACTGCGAAGGCCACCATG (29mer) (配列番号 14)

part primer(FITC 標識): GCGTAGAAGATCGTGGA (17mer, 3' half にアニール) (配列番号 15)

3' half: NNNTCCACGATCCTG TTCGCAGTATTCGCGAGCC (34mer, 下線部分はステム領域) (配列番号 16)

stem primer(biotin 標識): GGCTCGCGAATACTGCGAACAGGATCGTGGA (31mer) (配列番号 17)

part primer(FITC 標識): CTGCGAAGACCACCATG (17mer, 5' half にアニール) (配列番号 18)

part primer には MboII 認識部位が含まれており、stem primer には MboII で切断されないように変異を施してある。

MboII 認識部位：

GAAGANNNNNNN ↓

CTTCTNNNNNN ↑

シーケンス用プライマー

YLBS ライブラリーをペプチドとして発現させるため、T7 プロモーター及び FLAG-Prosite の一部を含む。

T7 side primer: AAGAAGGAGTTGCCACCATG(20mer) (配列番号 19)

POU side primer: TTATAGTCCAGGATCGTGGA(20mer) (配列番号 20)

使用コドン配列

小麦胚芽の codon usage と制限酵素 MboII の認識配列の回避を考慮して、以下のコドンを使用することとした。

表 5：

アミノ酸	コドン	アミノ酸	コドン
Phe	TTT	His	CAC
Leu	CTC	Gln	CAA
Ile	ATT	Asn	AAC
Met	ATG	Lys	AAA
Val	GTG	Asp	GAC
Ser	TCC	Glu	GAG
Pro	CCA	Cys	TGC
Thr	ACC	Trp	TGG
Ala	GCC	Arg	CGC
Tyr	TAC	Gly	GGC

実験の概要は以下に示す。

- (1) 3' half の 5' 末端リン酸化
- (2) 5' half 及び 3' half のハイブリダイゼーション及びライゲーション
- (3) 変性 PAGE によるライゲーション産物の精製
- (4) ライゲーション産物の PCR 増幅
- (5) 制限酵素 MboII 処理
- (6) 1 本鎖 DNA の調製(5' half 及び 3' half)
- (7) 次の YLBS サイクル

- (1) 3' half の 5' 末端リン酸化

T4 ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)を用いて 3' half の 5' 末端をリン酸化する。
この時、20 種類の 3' half をそれぞれ等モルずつ混合した溶液を用いる。

H ₂ O	2 μ l
3' half mixture	4 μ l
(各 20pmol, total 400pmol)	
10xPNK buffer	1 μ l
1mM ATP	1 μ l
T4 PNK(10U/ μ l, Takara)	2 μ l
Total	10 μ l

調製した溶液を 37°C で 1 時間インキュベーションした後、85°C で 15 分間加熱して酵素を失活させる。この反応液は 40pmol/ μ l の DNA 濃度となる。

- (2) 5' half 及び 3' half のハイブリダイゼーション及びライゲーション

5' half mixture	1 μ l (各 2pmol, total 40pmol)
3' half mixture	1 μ l (各 2pmol, total 40pmol)
(リン酸化済)	
1mM ATP	1 μ l

$2 \times \text{TRL}^* \quad 5 \mu\text{l}$ $2 \times \text{TRL}$

100mM Tris-HCl(pH8.0)

20mM MgCl_2

20mg/l BSA

1mM HCC(hexammine cobalt chloride)

50%(w/v) PEG6000

調製した溶液を 95℃で 2 分間加熱した後 65℃で 10 分間アニーリングさせる。その後室温まで冷却し、T4 RNA Ligase(25U/ul, Takara) を 2ul 加えて 25℃、オーバーナイトでインキュベーションする。

(3) 変性 PAGE によるライゲーション産物の精製

ライゲーション溶液にマーカー色素(0.5%BPB in formamide)10ul を混合し、8M 尿素 8%PAGE で分画する(300V, 160mA, 50 分間)。銀染色法で染色、目的のライゲーション産物のバンドをメスにより切り出し、1.5ml のチューブに入れる。ゲルの洗浄のため滅菌水を 1ml 加え、ミキサーで 5 分間攪拌後、滅菌水を除く。更に滅菌水を 50ul 添加し、ゲル破碎棒でよくゲルを潰す。卓上遠心機で遠心後、上清を PCR のテンプレートとする。

1cycle 目の YLBS(Y1)の結果を図 5 に示す。ライゲーション産物は 66mer である。これに対応する位置のバンドを切り出す。なお、ライゲーション産物は Y2 では 72mer、Y3 では 84mer になるはずである。

(4) ライゲーション産物の PCR 増幅

ライゲーション産物を増幅するとともに、次の YLBS サイクルの原料を調製するための PCR を 2 種類 (5' half 及び 3' half) 行う。

10×PCR 緩衝液	5μl
------------	-----

25mM MgCl₂ 5μl

ゲルの上清溶液(テンプレート)	5 μ l
5' または 3' stem primer(10pmol/ μ l)	1 μ l
5' または 3' part primer(10pmol/ μ l)	1 μ l
20mM dNTP	0.5 μ l
Taq ポリメラーゼ(グライナー)	1 unit
H ₂ O で	最終 50 μ l

反応は、94°Cで2分インキュベートした後、94°Cで30秒、60°Cで1分及び72°Cで30秒を1サイクルとし、これを30サイクル行った後、72°Cで5分インキュベートした。PCR終了後、反応液の一部(例えば5 μ l)を取り、上記(3)と同様のPAGEで分析する。この時、複数のバンドが出た場合には、目的産物のバンドを切り出して再度PCRを行うか、目的産物だけが増幅するPCRサイクル(目的産物が最初に増幅され、非特異的産物は後から増幅されてくる傾向がある)で再度行う。

(5) 制限酵素 MboII 処理

5' half 及び 3' half の PCR 産物をエタノール沈殿し、25 μ l の H₂O で溶解する。

5' half または 3' half	25 μ l
10xL 緩衝液	3 μ l
MboII(10U/ μ l, Takara)	2 μ l
Total	30 μ l

調製した溶液を 37°Cで2時間インキュベーションする。

(6) 1 本鎖 DNA の調製(5' half 及び 3' half)

各々の制限酵素消化物(30 μ l)に 20 μ l の H₂O を加える。これを 2xBW 緩衝液(0.2M Tris-HCl(pH8.0), 1M NaCl, 2% Tween20)で平衡化したダイナビーズ(streptavidin M-280)50 μ l と混合し、室温で1時間ミキサーにより攪拌する。この操作により PCR 産物がビーズに結合する。攪拌後、チューブを卓上遠心機で遠心し、更にマグネットを用いてビーズをチューブ壁面に確保する(以後、この操

作をビーズ確保と呼ぶ)。上清を除去し、200 μ l の 1xBW 緩衝液(0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.5M NaCl, 1% Tween20) で1回、200 μ l の H₂O で2回、ビーズ確保と上清除去を繰り返してビーズを洗浄する。ここに 25 μ l の 28%アンモニア水を添加し、攪拌して室温で2分間放置する。ビーズ確保後、上清を回収して保存する。もう一度この操作を繰り返す。上清は合わせて保存する(非ビオチン鎖)。ビーズを一度 200 μ l の H₂O で洗浄した後、25 μ l の 28%アンモニア水を添加して攪拌し、65°Cで20分間加熱する。ビーズ確保後、上清を回収して保存する。もう一度この操作を繰り返す。上清は合わせて保存する(ビオチン鎖)。

4種類の回収液を遠心濃縮機を用いて乾燥させる。この時 YLBS の次のサイクルに使用するのは、5' half がビオチンで標識された方の DNA 鎖で、3' half が未標識の DNA 鎖である。また、残りの回収物は回収効率の目安となるため、次サイクルの PAGE 分析の際に一緒に泳動する。

(7) 次の YLBS サイクル

回収後の 3' half の 5' 末端はリン酸化されているため、ステップ2のハイブリダイゼーションから同様の操作を繰り返す。

2回目及び3回目の Y L B S サイクル後の反応産物を電気泳動で分析した結果の電気泳動像を図6に示す。

図6において、レーン1から6は以下を示す。

レーン1：マーカー（上から 100mer, 90, 80, 70, 60, 50....）

レーン2：Y ligation を行ったサンプル(Y2 は 72mer, Y3 は 84mer, ビオチンがついているためやや上に出る)

レーン3：5'-half のビオチンがついていない方の鎖

レーン4：5'-half のビオチンがついている方の鎖 (Y ligation に使用した残り)

レーン5：3'-half のビオチンがついていない方の鎖 (Y ligation に使用した残り)

レーン6：3'-half のビオチンがついている方の鎖

60mer 付近の濃いバンドは MboII 処理で切断されなかった DNA(PCR 産物がそのまま残っている)、その下の濃いバンドは MboII で切断されたがライゲーションしなかった未反応 DNA と考えられる。

(シーケンスの結果)

Y3 後のライゲーション産物をシーケンス用プライマー(T7 side primer, POU side primer)で PCR 増幅し、TA クローニングキット(invitrogen)を用いてクローニングした。プラスミドを回収し、シーケンスを行った。シーケンスの結果を図 7 に示す。その結果、適切な長さのクローンは 10 サンプル中 4 つであった。更に、使用したコドンに対応しているものは 10 サンプル中 1 つであった。

表 6 :

アミノ酸	コドン	出現回数	アミノ酸	コドン	出現回数
Phe	TTT		His	CAC	7
Leu	CTC	5	Gln	CAA	2
Ile	ATT	3	Asn	AAC	2
Met	ATG	1	Lys	AAA	4
Val	GTG		Asp	GAC	5
Ser	TCC	7	Glu	GAG	
Pro	CCA	13	Cys	TGC	1
Thr	ACC	8	Trp	TGG	
Ala	GCC		Arg	CGC	
Tyr	TAC	3	Gly	GGC	

産業上の利用の可能性

本発明により、Y-ライゲーション法を利用した核酸ライブラリーを構築する方法が確立された。

本発明の方法は、長いペプチド鎖をコードする核酸ライブラリーを構築する際に反応段数を少なくでき、ブロック長を任意の長さに設定することができ、さらに各ブロックの出現頻度に極端な偏りは見られないという利点を有する。

本出願が主張する優先権の基礎となる日本特許出願である特願 2000-346467 号及び特願 2001-308277 号の明細書に記載の内容は全て本明細書の開示の一部として本明細書に引用するものとする。

請求の範囲

1. 以下の工程（１）から（７）を含む、核酸ライブラリーの作製方法。

（１）５’側から３’側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、３’末端に第１のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第１の一本鎖核酸と、３’側から５’側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、５’末端に第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第２の一本鎖核酸とを用意し、

（２）第１の一本鎖核酸と第２の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

（３）ハイブリダイズした生成物を T4 RNA リガーゼで処理して、第１の一本鎖核酸の３’末端と第２の一本鎖核酸の５’末端とを連結し、

（４）工程（３）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、５’側を親和性物質で修飾したプライマーを使用する P C R を行い、５’側から３’側の方向にステム配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程（３）で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、５’側を親和性物質で修飾したプライマーを使用する P C R を行い、５’側から３’側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第１のアミノ酸をコードする塩基配列、第２のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、

（５）工程（４）で得た２種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々３’末端又は５’末端に第１のアミノ酸と第２のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

（６）工程（４）で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程（５）で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

（７）工程（６）で得た一本鎖核酸を用いて工程（２）から工程（６）を必要な

回数だけ繰り返す：

2. 以下の工程（1）から（7）を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリーの作製方法。

（1）5'側から3'側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3'末端に第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第1の一本鎖核酸と、3'側から5'側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5'末端に第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第2の一本鎖核酸とを用意し、

（2）第1の一本鎖核酸と第2の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

（3）ハイブリダイズした生成物をT4 RNA リガーゼで処理して、第1の一本鎖核酸の3'末端と第2の一本鎖核酸の5'末端とを連結し、

（4 a）連結産物を一本鎖核酸にした後、相補鎖を合成して二本鎖核酸を調製し、

（4 b）工程（4 a）で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5'側を親和性物質で修飾したフォワードプライマーと制限酵素認識配列を含むリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向にステム配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程（4 a）で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含むフォワードプライマーと5'側を親和性物質で修飾したリバースプライマーとを使用するPCRを行い、5'側から3'側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第1のアミノ酸をコードする塩基配列、第2のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、

（5）工程（4 b）で得た2種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々3'末端又は5'末端に第1のアミノ酸と第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

（6）工程（4 b）で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程（5）

で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

(7) 工程 (6) で得た一本鎖核酸を用いて工程 (2) から工程 (6) を必要な回数だけ繰り返す：

3. 以下の工程 (1) から (7) を含む、請求項 1 に記載の核酸ライブラリーの作製方法。

(1) 5' 側から 3' 側の方向にステム配列とブランチ配列とを有し、3' 末端に第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第 1 の一本鎖核酸と、3' 側から 5' 側の方向に上記ステム配列と相補的なステム配列とブランチ配列とを有し、5' 末端に第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列を有する第 2 の一本鎖核酸とを用意し、

(2) 第 1 の一本鎖核酸と第 2 の一本鎖核酸とを各ステム配列間でハイブリダイズさせ、

(3) ハイブリダイズした生成物を T4 RNA リガーゼで処理して、第 1 の一本鎖核酸の 3' 末端と第 2 の一本鎖核酸の 5' 末端とを連結し、

(4) 工程 (3) で得た二本鎖核酸を鋳型にして、5' 側を親和性物質で修飾した、第 1 の一本鎖核酸のステム配列にアニールするフォワードプライマーと、制限酵素認識配列を含み、第 2 の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするリバースプライマーとを使用する PCR を行い、5' 側から 3' 側の方向にステム配列、ブランチ配列、第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列、第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列、及び制限酵素認識配列を含む二本鎖核酸を調製し、また

工程 (3) で増幅した二本鎖核酸を鋳型にして、制限酵素認識配列を含み、第 1 の一本鎖核酸のブランチ配列にアニールするフォワードプライマーと、5' 側を親和性物質で修飾した、第 2 の一本鎖核酸のステム配列にアニールするリバースプライマーとを使用する PCR を行い、5' 側から 3' 側の方向に制限酵素認識配列、ブランチ配列、第 1 のアミノ酸をコードする塩基配列、第 2 のアミノ酸をコードする塩基配列、ブランチ配列及びステム配列を含む二本鎖核酸を調製し、

(5) 工程(4)で得た2種の二本鎖核酸を制限酵素で処理することにより、各々3'末端又は5'末端に第1のアミノ酸と第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する二本鎖核酸を調製し、

(6) 工程(4)で導入した親和性物質による結合能を利用して、工程(5)で得た二本鎖核酸から一本鎖核酸を調製し、そして

(7) 工程(6)で得た一本鎖核酸を用いて工程(2)から工程(6)を必要な回数だけ繰り返す：

4. 第1の一本鎖核酸として、異なる複数種の第1のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用し、第2の一本鎖核酸として、異なる複数種の第2のアミノ酸をコードする塩基配列を有する一本鎖核酸の混合物を使用する、請求項1から3の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

5. ステム配列の長さが10から100塩基である、請求項1から4の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

6. 第1の一本鎖核酸のステム配列が5'側から3'側の方向においてGGCTCGCGAATACTTTGであり、第2の一本鎖核酸のステム配列が3'側から5'側の方向においてCCGAGCGCTTATGA AACである、請求項1から5の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

7. ブランチ配列の長さが10から100塩基である、請求項1から6の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

8. 第1の一本鎖核酸のブランチ配列が5'側から3'側の方向においてAAGATCTCTTTTであり、第2の一本鎖核酸のブランチ配列が3'側から5'側の方向においてTTGCCCTAGGGGATである、請求項1から7の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

9. 工程(4)において、連結産物を変性条件下において一本鎖核酸にした後、PCRにより増幅して二本鎖核酸を調製する、請求項1から8の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

10. 工程(4)で使用するプライマーにおける親和性物質がビオチンである、

請求項 1 から 9 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

1 1. 工程 (4) で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列が、切断部位が認識配列に含まれない制限酵素の認識配列である、請求項 1 から 1 0 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

1 2. 工程 (4) で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列が、認識配列から離れたところで切断する制限酵素の認識配列である、請求項 1 から 1 1 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

1 3. 工程 (4) で使用するプライマーにおける制限酵素認識配列が、MboII の認識配列である、請求項 1 から 1 2 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

1 4. 工程 (2) から工程 (6) を合計 4 回繰り返すことにより 1 6 アミノ酸をコードする塩基配列を含む核酸のライブラリーを作製する、請求項 1 から 1 3 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法。

1 5. 請求項 1 から 1 4 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリー。

1 6. 請求項 1 から 1 4 の何れかに記載の核酸ライブラリーの作製方法により作製される核酸ライブラリーを用いて得られる、ペプチドライブラリー。

図 1

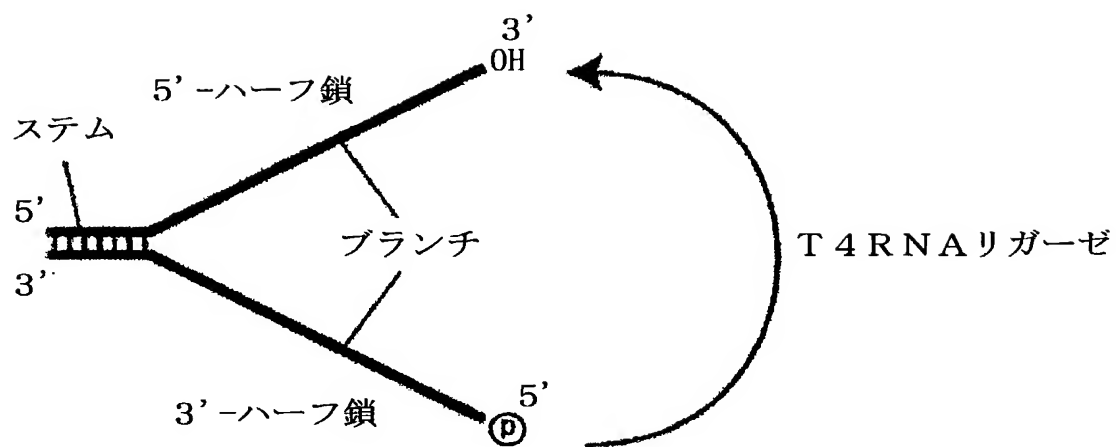


図 2

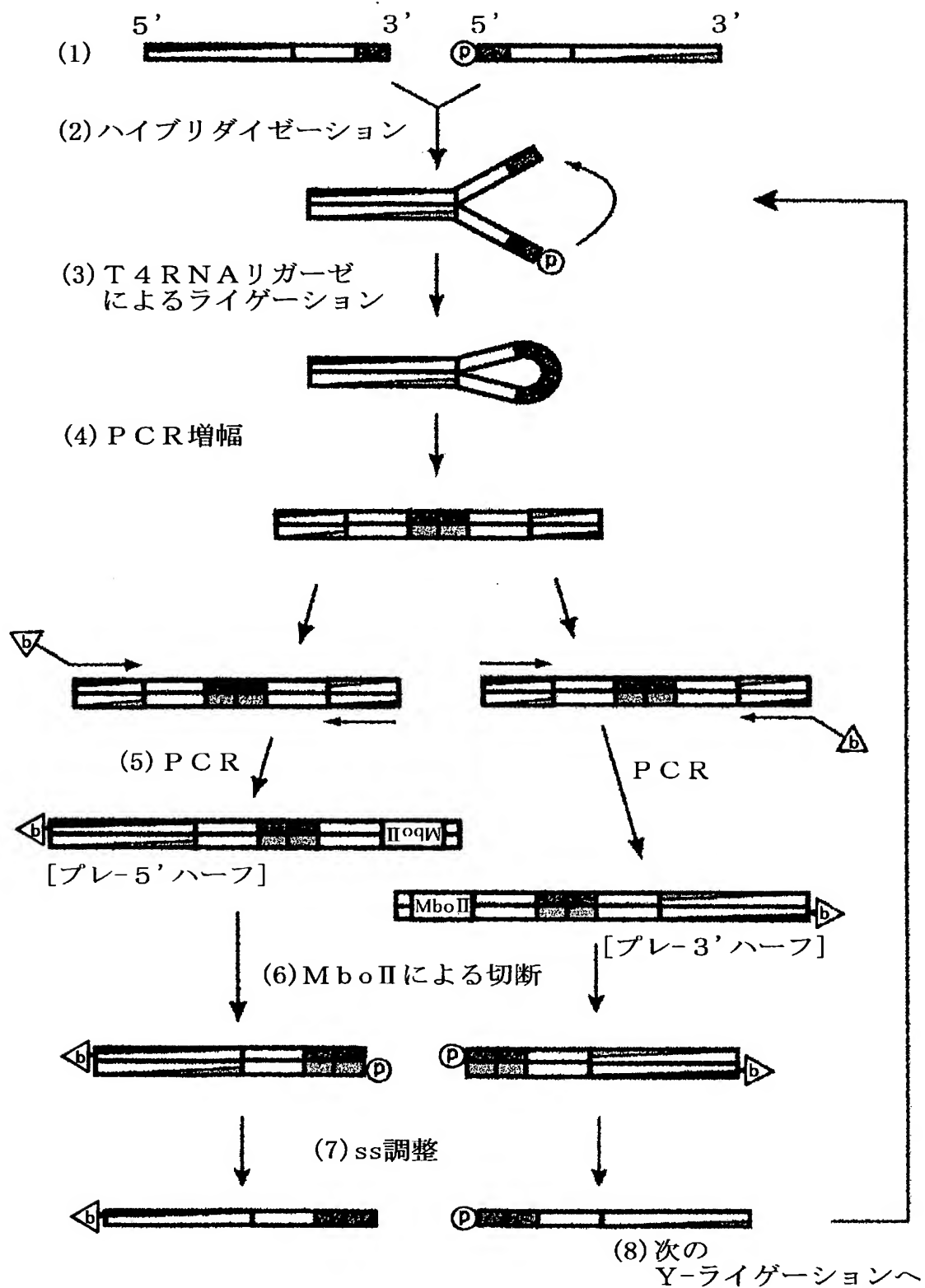
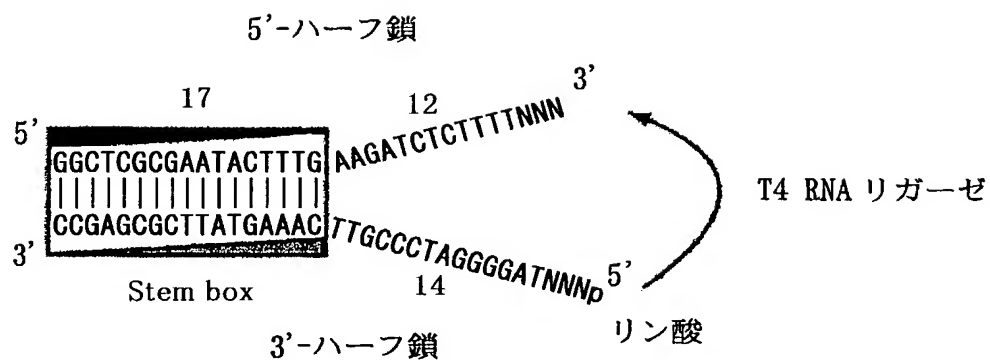


図 3

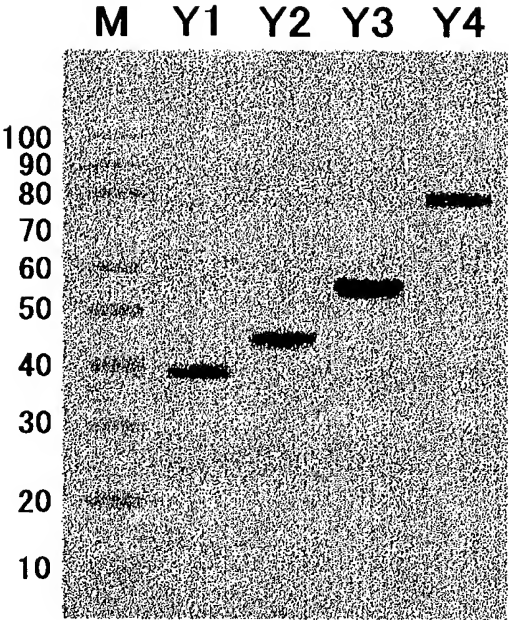
(a)



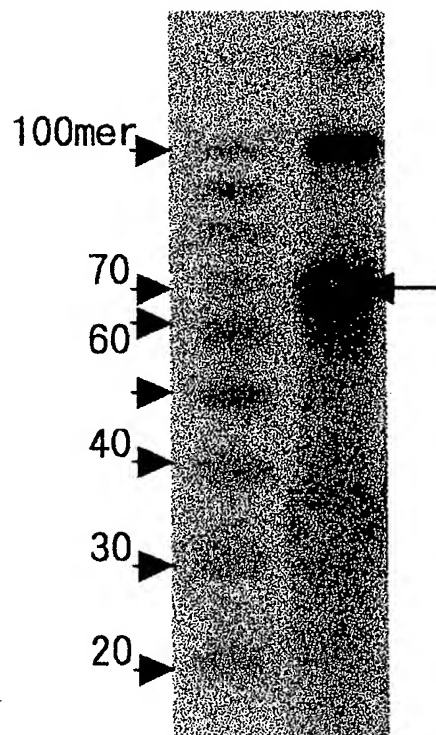
(b)



図 4

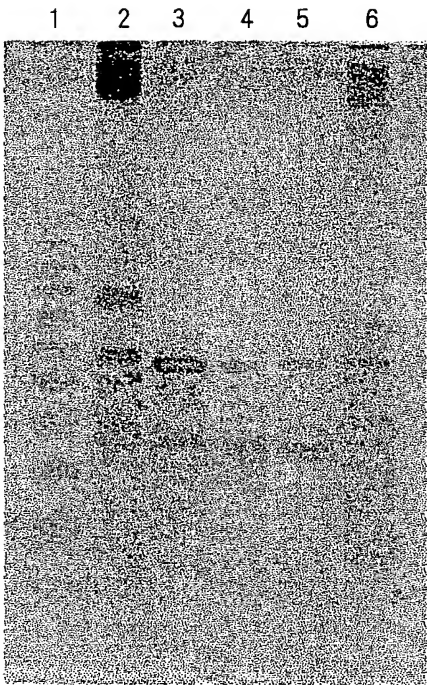


⊗ 5



⊗ 6

Y2



Y3

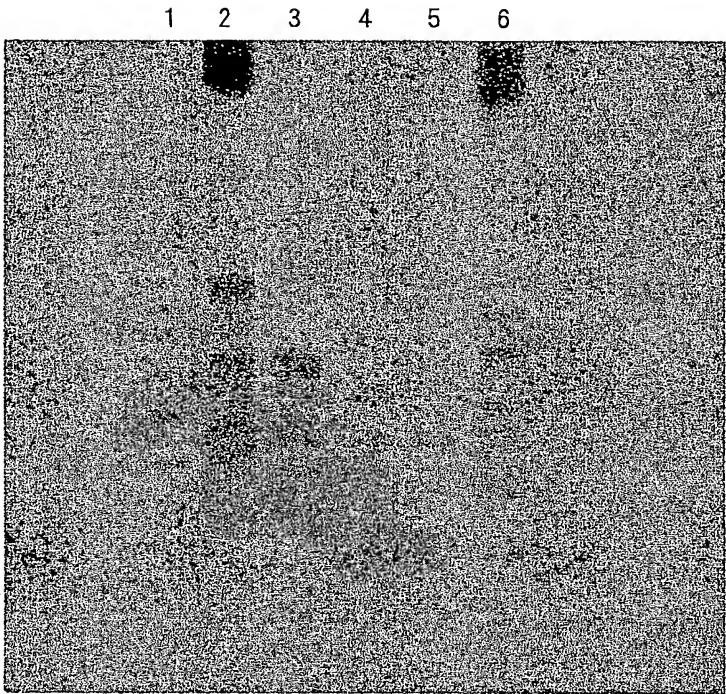


図 7

#1 (配列番号 2 1)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG AAA AGA CCA CCC CCA CCA CCC AG TCCACGATCCTGGACTATAA
Lys - Pro - Pro Pro - -

#2 (配列番号 2 2)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG GAC TCC CTC AAG CAC TCC TAC CAG TCCACGATCCTGGACTATAA
Asp Ser Leu - His Ser Tyr -

#3 (配列番号 2 3)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG CG AAC ACT ACC ACC ACC CCA ACC TCCACGATCCTGGACTATAA
- Asn - Thr Thr Thr Pro Thr

#4 (配列番号 2 4)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG CCA TAG CCA TAC CCA GAC CTC ACC TCCACGATCCTGGACTATAA
Pro - Pro Tyr Pro Asp Leu Thr

#5 (配列番号 2 5)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG GA CCA CCA TCC CCA TCC ACC TAC TCCACGATCCTGGACTATAA
- Pro Pro Ser Pro Ser Thr Tyr

#6 (配列番号 2 6)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG CAC CAC CTC AAA GC TCC TGC TCC TCCACGATCCTGGACTATAA
His His Leu Lys - Ser Cys Ser

#7 (配列番号 2 7)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG GAC TCC ACC CTT CCA TCA CCA T GAC TCCACGATCCTGGACTATAA
Asp Ser Thr - Pro - Pro -

#8 (配列番号 2 8)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG CTC ACC CAA CAC ATT CAC CAC ATG TCCACGATCCTGGACTATAA
Leu Thr Gln His Ile His His Met

#9 (配列番号 2 9)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG CTC AAC CAA AAA GC TCC ATT GAC TCCACGATCCTGGACTATAA
Leu Asn Gln Lys - Ser Ile Asp

#10 (配列番号 3 0)

AAGAAGGAGTTGCCACCATG AAA CCA ACA ACT CGA TAT ATC CTT TCCACGATCCTGGACTATAA
Lys Pro - - - - -

SEQUENCE LISTING

<110> GenCom

<120> A method for preparing a library of nucleic acids

<130> A11409MA

<160> 30

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

ggctcgcgaa tactttg 17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

ccgagcgctt atgaaac 17

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

aagatctctt tt 12

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ttgccctagg ggat 14

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ttgaagatct ctttt 15

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ttgaacggga tccccta 17

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ggctcgcgaa tactttgggg atctcttt 28

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

ttgacgaaga tccccta 17

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ggctcgcgaa tactttg 17

<210> 10

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

ttgaagatct cttt 14

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ggctcgcgaa tactttgaac gggatcccct a 31

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggctcgcgaa tactttgaa 19

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

ggctcgcgaa tactgcgaag accaccatgn nn 32

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

ggctcgcgaa tactgcgaag gccaccatg 29

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gcgtagaaga tcgtgga 17

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

nnntccacga tcctgttcgc agtatttcgcg agcc 34

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ggctcgcgaa tactgcgaac aggatcgtgg a 31

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ctgcgaagac caccatg 17

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

aagaaggagt tgccaccatg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

ttatagtcca ggatcgtgga 20

<210> 21

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

aagaaggagt tgccaccatg aaaagaccac cccaccacc cagtccacga tcctggacta 60

taa 63

<210> 22

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

aagaaggagt tgccaccatg gactccctca agcactccta ccagtccacg atcctggact 60

ataa 64

<210> 23

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

aagaaggagt tgccaccatg cgaacactac caccacccca acctccacga tcttgga 60
taa 63

<210> 24

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

aagaaggagt tgccaccatg ccatagccat acccagacct cacctccacg atcttgga 60
ataa 64

<210> 25

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

aagaaggagt tgccaccatg gaccaccatc cccatccacc tactccacga tcttgga 60
taa 63

<210> 26

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 26

aagaaggagt tgccaccatg caccacctca aagctcctgc tcctccacga tcctggacta 60
taa 63

<210> 27

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 27

aagaaggagt tgccaccatg gactccaccc ttccatcacc atgactccac gatcctggac 60
tataa 65

<210> 28

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 28

aagaaggagt tgccaccatg ctcacccaac acattcacca catgtccacg atcctggact 60
ataa 64

<210> 29

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 29

aagaaggagt tgccaccatg ctcaaccaaa aagctccatt gactccacga tcttggacta 60
taa 63

<210> 30

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 30

aagaaggagt tgccaccatg aaaccaacaa ctgatatat ctttccacg atcctggact 60
ataa 64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09200

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/10, C07H21/00, C07K5/00, C07K7/00, C07K4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/10, C07H21/00, C07K5/00, C07K7/00, C07K4/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOSIS NO.: 200000271512 & Koichi NISHIGAKI, et al., "An efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase", Molecular Diversity, (1998), Vol.4, No.3, pages 187 to 190	1-16
P,A	BIOSIS NO.: 200100516855 & Wu NING, et al., "Negative selection of intact mRNA for full-length cDNA library construction", International Genome Sequencing and Analysis Conference, (2000), Vol.12, page 98	1-16
A	BIOSIS NO.: 199497045319 & Apte Aaron N., et al., "Anchor-ligated cDNA *libraries*: a technique for generating cDNA *library* for the immediate cloning of the 5' ends of mRNAs", Biotechniques, (1993), Vol.15, No.5, pages 890 to 893	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 December, 2001 (14.12.01)Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/09200

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOSIS NO.: 199799795549 & Yasunori KINOSHITA, et al., "Flourensence-, isotope- or biotin-labeling of the 5' -end of single-stranded DNA/RNA using T4 RNA ligase", Nucleic Acids Research, (1997), Vol.25, No.18, pages 3747 to 3748	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/10, C07H21/00, C07K5/00, C07K7/00, C07K4/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/10, C07H21/00, C07K5/00, C07K7/00, C07K4/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS) WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BIOSIS NO.:200000271512 & Koichi NISHIGAKI., et al., An efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase, Molecular Diversity (1998), Vol. 4, No. 3, p.187-190	1-16
P, A	BIOSIS NO.:200100516855 & Wu NING., et al., Negative selection of intact mRNA for full-length cDNA library construction, International Genome Sequencing and Analysis Conference (2000), Vol.12, p. 98	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 12. 01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BIOSIS NO. :199497045319 & Apte Aaron N., et al., Anchor-ligated cDNA *libraries*: A technique for generating cDNA *library* for the immediate cloning of the 5' ends of mRNAs, Biotechniques (1993), Vol.15, No.5, p.890-893	1 - 16
A	BIOSIS NO. :199799795549 & Yasunori KINOSHITA., et al., Fluorescence-, isotope- or biotin-labeling of the 5' -end of single-stranded DNA/RNA using T4 RNA ligase, Nucleic Acids Research (1997), Vol.25, No.18, p.3747-3748	1 - 16